

EFFETS DE L'ACIDE SULFURIQUE SUR LA SURFACE DES GRAINES D'*ERIOSYCE AURATA*.

Ce document a été composé par Félix Simon à partir des travaux et du rapport réalisés par Aline Brachet, Hélène Lienhart, Célia Maringue et Félix Simon pour leur TIPE dans le cadre des classes préparatoires aux grandes écoles, filière BCPST, durant l'année scolaire 2009-2010.

Résumé :

Nous tentons ici d'expliquer comment la scarification de la surface des graines d'*Eriosyce aurata* à l'acide sulfurique permet d'améliorer leur cinétique de germination. Pour cela, nous montrons qu'un traitement de 10 minutes est optimal, puis nous cherchons à expliquer comment l'action de l'acide permet une meilleure imbibition des graines et leur germination plus rapide, en comparant ses effets à ceux de 2 autres modes de scarification. Sans parvenir à reproduire les effets de l'acide sur la vitesse de germination, ces deux méthodes favorisent l'imbibition de la graine.

Table des matières

Méthodes générales d'étude.....	3
Origine du matériel biologique.....	3
Présentation de la méthode des semis en sachets.....	3
Suivi des cultures.....	3
Durée optimale du traitement de surface à l'acide sulfurique.....	3
Protocole des traitements par l'acide sulfurique.....	4
Recherche de la durée optimale du traitement de surface.....	4
Cinétique de germination.....	4
Qualité des plantes obtenues.....	4
Recherche des effets de l'acide sur la surface de la graine.....	5
Par l'observation à la loupe binoculaire.....	5
Par l'observation au microscope électronique.....	6
Par la mesure de l'imbibition des graines.....	6
Une action mécanique a-t-elle les mêmes effets que l'action de l'acide sulfurique ?.....	7
Première tentative de scarification mécanique : la scie sauteuse.....	7
Protocole.....	7
Résultats : cinétique de germination.....	7
Recherche des effets de la scarification mécanique sur la surface de la graine.....	7
Par l'observation de la surface des graines à la loupe binoculaire.....	7
Par l'observation de la surface des graines au MEB.....	7
Par la mesure de l'imbibition des graines.....	8
Seconde tentative de scarification : le cutter.....	9
Résultats : cinétique de germination.....	9
Recherche des effets de la scarification mécanique sur la surface de la graine par la mesure de l'imbibition des graines.....	9
Conclusion.....	10
Bibliographie, webographie.....	10
Remerciements.....	10

Eriosyce aurata (figure 1) est une Cactaceae endémique du Chili, pouvant atteindre la dimension de 50 cm de diamètre pour 90 cm de hauteur, mais à la croissance extrêmement lente. Son épiderme est vert clair et il possède de 24 à 42 côtes munies d'aréoles portant un grand nombre de fortes épines de couleur jaune orangé qui blanchissent en vieillissant. Quand la plante est mature, elle peut porter des fleurs rouges à gorge orangée.

Il pousse dans des conditions très arides, et doit faire face à la fragmentation de son habitat du fait des activités minières et agricoles, ainsi qu'à une collecte illégale. Cela a eu pour effet de réduire les populations, diminuant du même coup leur capacité de renouvellement et leur richesse génétique. Sa rareté en collection est due à la difficulté de sa culture, à sa pousse très lente, et surtout à la très forte dormance de ses graines. Pour toutes ces raisons, *Eriosyce aurata* est inscrit à l'annexe 2 de la CITES¹.

Nos recherches bibliographiques nous ont montré que le traitement de la surface de ses graines par l'acide sulfurique concentré est efficace pour lever leur dormance. Cela nous a intrigué, et nous nous efforcerons à l'aide de nos expériences de répondre à la problématique suivante : **Comment ce traitement agit-il sur la surface tégumentaire des graines et améliore-t-il leur germination ?**

Pour cela nous allons commencer par présenter le matériel biologique et les méthodes d'études utilisées, puis nous testerons le traitement à l'acide et observerons ses effets sur les graines, et enfin nous tenterons de reproduire les effets de l'acide sulfurique par des méthodes strictement mécaniques.



Figure 1: Un des *Eriosyce aurata* RCP12, dont sont issues les graines utilisées. Photographie Alain Laroze.

¹ Convention on International Trade in Endangered Species

Origine du matériel biologique

Les graines que nous avons utilisé portent le numéro de collecte RCP12, qui désigne une population d'*Eriosyce aurata* poussant à proximité du parc national Bosque Fray Jorge au Chili (bordure sud du désert d'Acatama). Elles nous ont été transmises par Alain Laroze.

Cette origine commune a l'avantage expérimental de limiter la variabilité génétique des individus obtenus. Pour conserver cet avantage, nous avons choisi de ne travailler qu'avec ces graines, mais la contrepartie est que les lots utilisés ne sont que de 16 graines pour chacune des expériences qui suivront.

Présentation de la méthode des semis en sachets



Figure 2: Pot dans son sachet.

Eriosyce aurata est comme beaucoup de cactus très fragile vis à vis des maladies cryptogamiques, et le semis de cette plante est particulièrement délicat du fait de sa lenteur de croissance. Nous avons choisi pour notre TIPE la méthode dite des « semis en sachets » qui consiste à faire germer et pousser les plantules dans le milieu le plus propre possible.

Pour cela, le substrat composé à 50% de terreau et à 50% de vermiculite est passé à la cocotte minute durant une heure. Des pots désinfectés à l'eau de Javel sont remplis avec ce substrat et le tout est mis à tremper quelques minutes dans de l'eau bouillie additionnée d'un peu de fongicide². Un fois cela accompli, chaque pot est mis dans un sachet en plastique fermé hermétiquement (figure 2).

Cette méthode a aussi des intérêts pratiques et expérimentaux : chaque pot reçoit au début la même quantité d'eau, qui ne varie pas car les plantes ne sont pas arrosées, et chaque plantule est exposée à la même luminosité.

Au fur et à mesure que les expériences sont réalisées, les graines sont semées dans les pots préalablement préparés. On voit ici les limites de cette méthode de semis, puisque les sachets doivent être ouverts pour le semis, et par la suite pour le suivi des plantules, alors qu'ils devraient rester fermés pour éviter toute contamination.

Une fois les graines semées, elles sont mises à germer dans un endroit lumineux et chaud. Pour la première expérience nous avons utilisé une boîte avec des tubes fluorescents, avec une température moyenne sous tubes de 23°C. Pour la seconde expérience, nous avons utilisé un phytotron réglé à 27°C. Dans les deux cas la photopériode était de 12h.

Suivi des cultures

Plusieurs méthodes sont utilisées pour suivre les semis :

- Comptage des graines germées : la pratique la plus courante est de compter une graine comme germée une fois que la radicule est aussi grande que la graine initiale. Du fait d'anomalies de développement, nous avons préféré compter comme germée une graine dont l'embryon a fendu le tégument.
- Pour observer la surface des graines nous avons réalisé des clichés à la loupe binoculaire et nous avons également eu la chance de pouvoir réaliser des photos au microscope électronique à balayage environnemental (ESEM), mais bien sûr en nombre limité (ce qu'il faut prendre en compte lors de l'examen des données).

Durée optimale du traitement de surface à l'acide sulfurique

En faisant des recherches bibliographiques sur le traitement des graines d'*Eriosyce aurata* par l'acide sulfurique concentré, nous avons trouvé des informations contradictoires, notamment par rapport au temps de traitement

² « Désinfectant du sol » de marque Vilmorin, produit actif principal : Cryptonol.

optimal : 15^[2] ou 26,8^[1] minutes. Puisque nous avons décidé de tenter d'expliquer l'action de l'acide sulfurique, il nous a fallu commencer par déterminer lequel de ces deux temps choisir.

Protocole des traitements par l'acide sulfurique

Les lots de graine ont été plongés dans de l'acide sulfurique à 96%³ pendant des temps différents : 0, 10, 20, 30, 40 et 50 minutes. Les graines ont ensuite été rincées cinq minutes dans de l'eau et enfin semées, chaque lot dans un sachet différent.

Recherche de la durée optimale du traitement de surface

Ce temps de traitement optimal sera considéré comme étant celui qui maximise la germination tout en minimisant les atteintes au bon développement de la plantule.

Cinétique de germination

Les résultats de l'expérience sont présentés sur la figure 3.

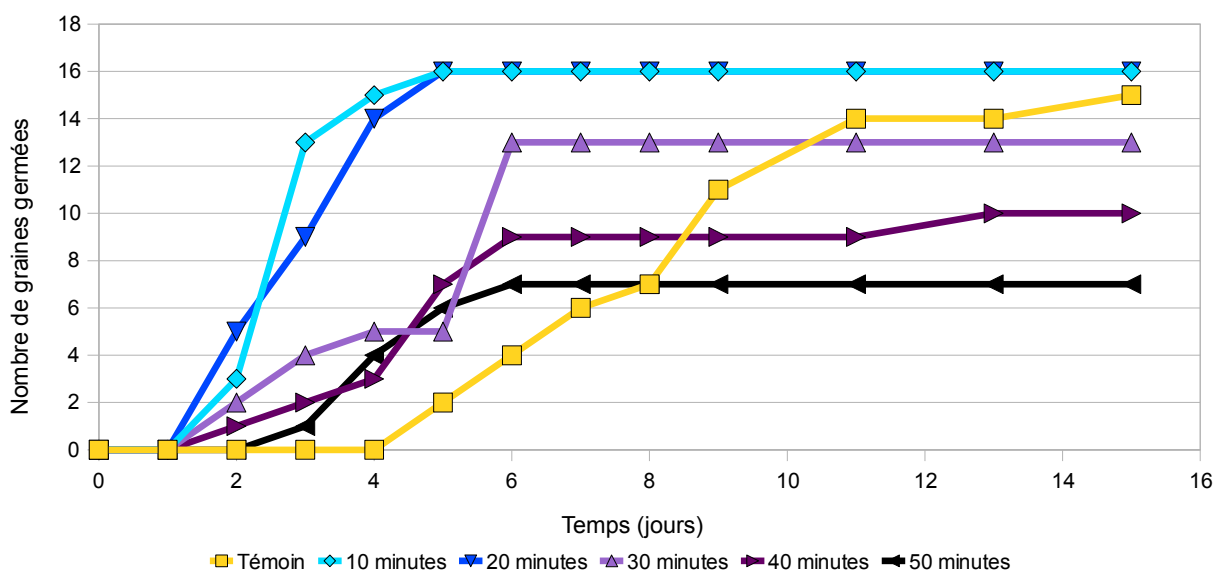


Figure 3: Influence de la durée du traitement à l'acide sulfurique sur la germination.

Nous observons que le temps nécessaire pour atteindre 50% de germination (appelé temps caractéristique) augmente avec la durée du traitement, mais qu'il reste toujours inférieur à celui du lot témoin.

Plusieurs remarques peuvent être faites :

- Les graines utilisées avaient été semées peu après leur récolte, en 2006, et elles étaient alors dormantes⁴. Puisque pour nous la quasi totalité des graines a germé après 15 jours, on peut supposer que la dormance est levée au cours du temps. Dans la suite du rapport nous considérons donc la cinétique de germination au lieu de la dormance.
- Le temps optimal de traitement est de 10 ou 20 minutes.

Qualité des plantes obtenues

Des anomalies de croissance couramment observées sont présentées sur les figures 4 à 7. Leur gravité et leur fréquence s'accroissent avec le temps de traitement. La barre rouge d'échelle représente 1 cm, et les temps de trempage sont indiqués en rouge. Les plantules n'ont pas le même âge.

Les plantules obtenues pour 20 minutes de trempage présentent des anomalies de croissance, ce qui n'est pas le

³ D'après [1], une concentration inférieure à 95% est inefficace.

⁴ Communications personnelles de Georges Marchand et Alain Laroze : 2 graines germées sur 205 semées en 2006.

cas pour dix minutes. Nous considérerons donc que le temps de traitement optimal est de 10 minutes.



Figure 4: Plantule en bonne santé.



Figure 5: La racine reste à la surface du substrat sur quelques centimètres, ce qui n'arrive pour aucun des lots témoins (y compris pour les expériences suivantes), mais semble ne rien changer à la taille finale de la plantule.



Figure 6: Grande variété d'anomalies de croissance sans doute dues à la destruction de cellules par l'acide. 1 : plantule difforme, 2 : apex détruit, 3 : plantule de quelques millimètres.



Figure 7: 1) l'embryon est toujours prisonnier du tégument. 2) Rides dues à un manque d'eau. 3) Racine non développée.

Recherche des effets de l'acide sur la surface de la graine

Par l'observation à la loupe binoculaire

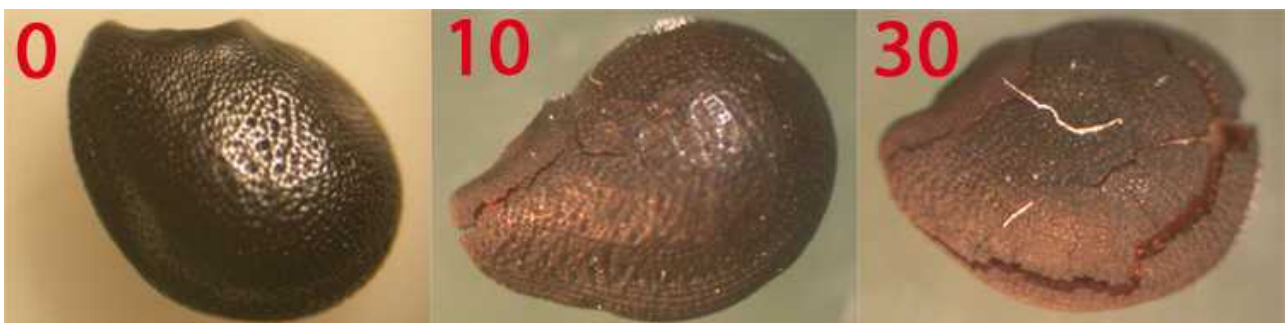


Figure 8: Sur la graine témoin on observe des sortes de cavités à la surface du tégument qui sont plus ou moins larges selon leur emplacement. Des fissures apparaissent après 10 minutes. Après 40 minutes les fissures sont bien plus conséquentes. Les anomalies de croissance sont donc sans doute dues à l'attaque de l'embryon par l'acide.

La figure 8 représente les graines après différents temps de traitement, indiqués en rouge. Elles ont ensuite été

mises à tremper pendant 24 heures dans de l'eau à 23°C. Une graine mesure environ 2 millimètres de long.

Par l'observation au microscope électronique

Trois des clichés obtenus se trouvent en figures 9, 10 et 11.

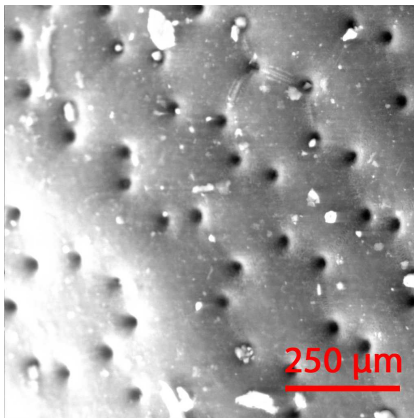


Figure 9: Graine témoin et ses cavités. (ESEM x400)

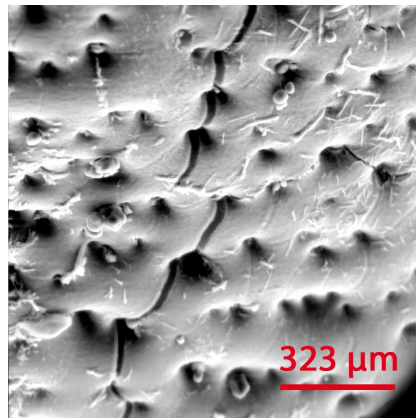


Figure 10: 10 minutes de traitement. Apparition de fissures. (ESEM x310)

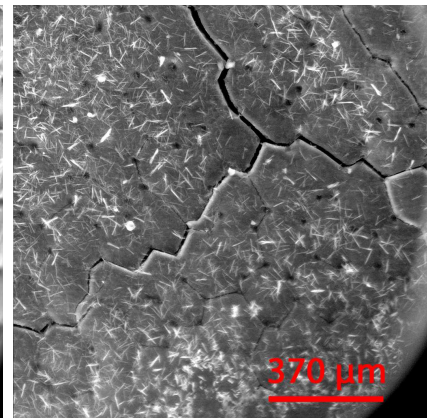


Figure 11: 50 minutes de traitement. Nombreuses micro-fissures. (ESEM x270)

On peut observer que les fractures précédentes ont leur équivalent au niveau microscopique, et qu'elles passent par les cavités tégumentaires, ce qui peut nous laisser penser que ces cavités constituent des points de faible résistance du tégument. Les baguettes blanches sont sans doute des cristaux dus à l'action de l'acide.

L'acide sulfurique étant un puissant déshydratant, on peut supposer que les fissures sont en fait des fentes de dessiccation. Cette hypothèse demanderait à être testée, par exemple en traitant les graines avec un autre acide possédant quand à lui peu de propriétés déshydratantes.

Les fissures pourraient permettre une meilleure imbibition de la graine, et ainsi accélérer la germination. C'est ce que nous avons cherché à tester.

Par la mesure de l'imbibition des graines

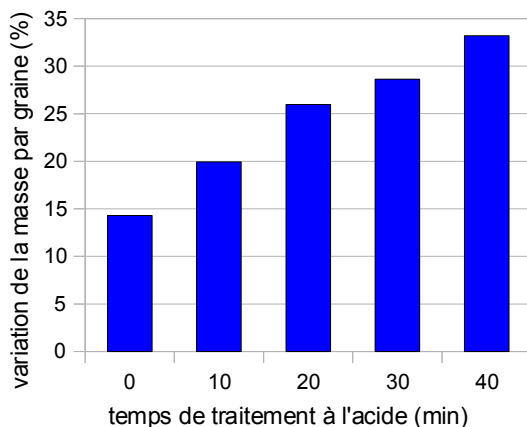


Figure 12: Variation de la masse d'une graine après imbibition.

D'autres graines ont été trempées pendant 24 heures dans de l'eau à 23°C après un passage plus ou moins long dans l'acide (voir figure 8), et la variation de leur masse a été mesurée. Les valeurs ont été obtenues en faisant une moyenne sur des lots de 10 graines avec une balance précise au dixième de milligramme près.

La figure 12 montre que plus le temps de traitement à l'acide sulfurique est important, plus l'imbibition est importante.

Nous avons montré que le traitement à l'acide sulfurique est responsable de l'augmentation de l'imbibition des graines, ce qui pourrait être en partie responsable de l'accélération de la germination. On peut penser que le tégument est partiellement hydrophobe et que les fissures apparues permettent le passage de l'eau à travers cette barrière.

Il aurait été intéressant de laisser imbiber les graines témoins pendant un temps plus long, afin de voir si leur masse peut augmenter autant que celle des graines traitées, et les semer ensuite afin de comparer la cinétique de germination à celle des graines traitées.

Nous allons maintenant tenter de reproduire les fissures dues à l'action de l'acide mais de façon purement mécanique, afin de voir si leur seule présence suffit à reproduire les effets de l'acide sur la germination ou si une autre

action (par exemple la dégradation de molécules inhibant la germination) se superpose.

Une action mécanique a-t-elle les mêmes effets que l'action de l'acide sulfurique ?

Première tentative de scarification mécanique : la scie sauteuse.

Protocole



Figure 13: Dispositif utilisé pour la scarification mécanique

La scarification est souvent réalisée en entaillant la surface de la graine au cutter^[2]. Cependant, ce procédé nous paraissant non reproductible pour de multiples graines, nous avons cherché un moyen de traitement plus homogène. Nous avons donc fixé un tube à essai rempli avec un peu de sable grossier et des graines à la lame d'une scie sauteuse (figure 13) et actionné la scie à pleine puissance pendant un temps variable : 30 minutes, une heure et deux heures.

Nous espérons que les chocs sur les parois du tube à essai allaient fracturer l'enveloppe des graines et créer des fissures.

Résultats : cinétique de germination

Après avoir semé les graines traitées, nous avons à nouveau suivi leur germination et nous avons obtenu les courbes présentées en figure 14 : la cinétique n'a rien à voir avec la précédente. Aucune des graines traitées pendant 1 et 2 heures n'a germé, et seulement trois graines traitées pendant 30 minutes ont germé et ce au bout de 5 jours.

Nous pensons que les embryons ont été endommagés par leur passage à la scie sauteuse.

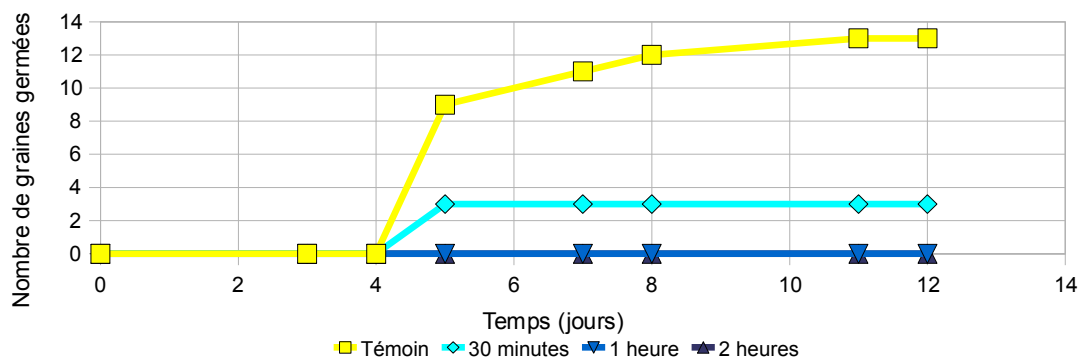


Figure 14: Influence de la durée du traitement à la scie sauteuse sur la germination.

Recherche des effets de la scarification mécanique sur la surface de la graine

Par l'observation de la surface des graines à la loupe binoculaire

A la loupe binoculaire nous pouvons constater que les cavités des graines sont remplies de sable et que les graines sont plus lisses.

Par l'observation de la surface des graines au MEB

Comme nous pouvons le voir sur les figures 15 et 16, il semble que la scie sauteuse ait poli le tégument. Par contre nous n'observons pas de fissures, y compris à l'échelle microscopique.

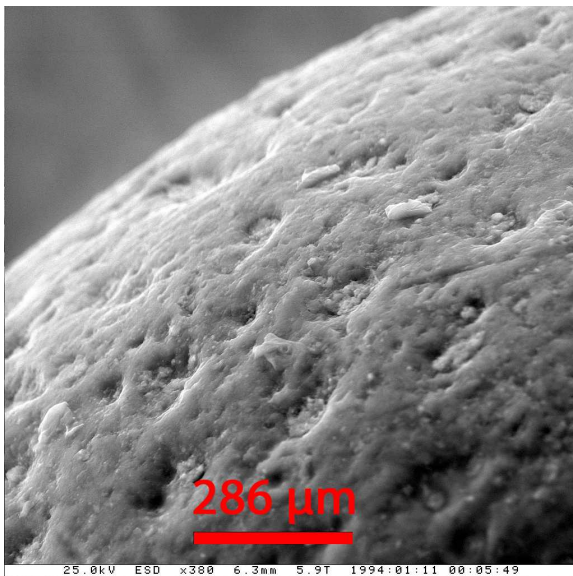


Figure 15: 30 minutes de traitement. (ESEM x350)

En comparaison avec la figure 9 :

- La surface paraît bien moins lisse entre les cavités.
- Les cavités sont moins nombreuses et semblent bouchées par du sable résiduel.
- Il n'y a pas de fissures.

Par la mesure de l'imbibition des graines

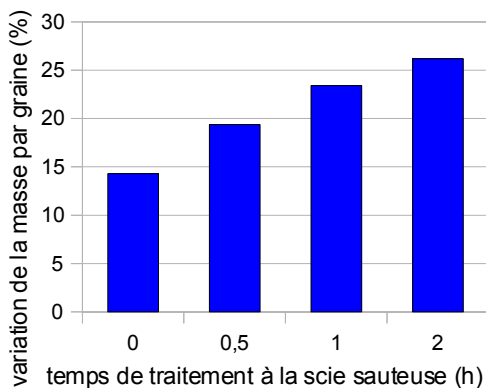


Figure 17: Variation de la masse d'une graine après imbibition.

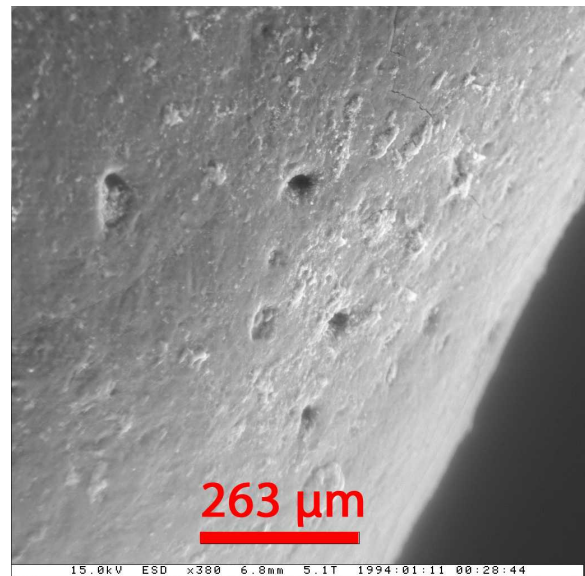


Figure 16: 1 h de traitement. (ESEM x380)

On compare maintenant la figure 16 avec la figure 9 et la 15 :

- La surface est plus lisse.
- Les cavités sont encore moins nombreuses.

Nous avons réalisé une expérience d'imbibition en reproduisant le même protocole que précédemment. On remarque sur la Figure 17 que plus le temps de traitement est long, plus l'imbibition est importante.

Le tégument semble donc avoir été perméabilisé sans pour autant avoir été fissuré.

Puisque la surface de la graine a tout de même été polie, on peut supposer que la partie en surface du tégument est plus fortement hydrophobe que le reste, l'imbibition des graines témoins étant possible grâce aux cavités tégumentaires comme cela est schématisé sur la Figure 18.

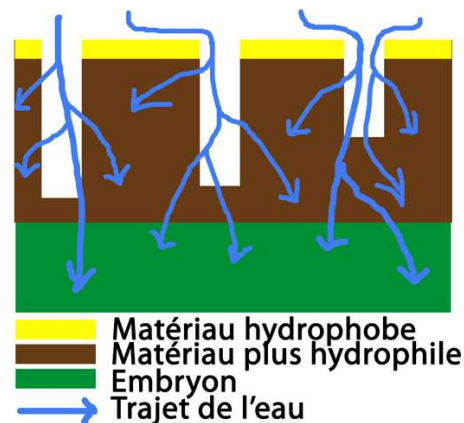
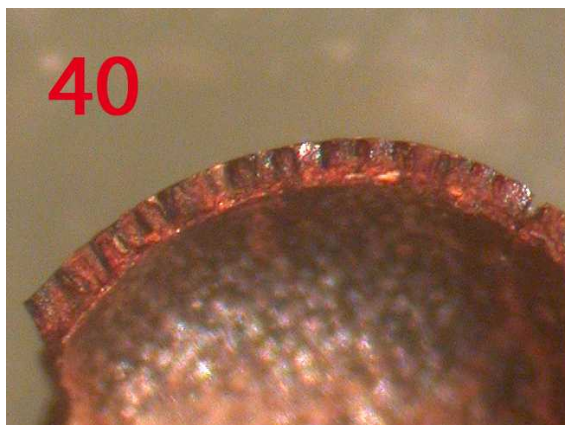


Figure 18: Schéma interprétatif de la structure du tégument établi à partir de l'observation de la photographie de gauche et des expériences précédentes. L'idéal aurait été de pouvoir étudier au microscope une coupe transversale fine du tégument.

Cette expérience de scarification mécanique ayant échoué à reproduire le traitement par l'acide sulfurique, nous avons décidé d'en tenter une nouvelle.

Seconde tentative de scarification : le cutter

Afin de minimiser autant que possible la variabilité de ce traitement nous nous sommes efforcé d'effectuer des entailles de même profondeur et au niveau de la même région de la graine, et ce en travaillant sous la loupe binoculaire.

Résultats : cinétique de germination

La cinétique de germination des graines scarifiées est présentée Figure 19.

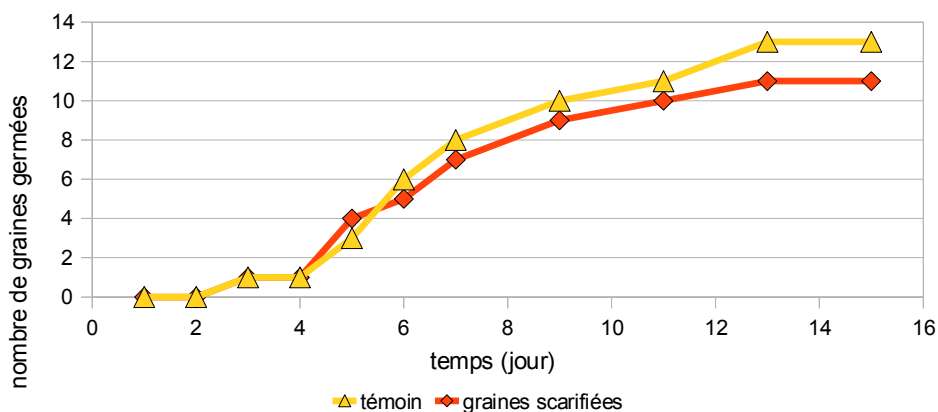


Figure 19: Influence de la scarification au cutter sur la germination.

Les temps caractéristiques présentent une différence de seulement un jour, et il n'y a pas d'amélioration.

Recherche des effets de la scarification mécanique sur la surface de la graine par la mesure de l'imbibition des graines

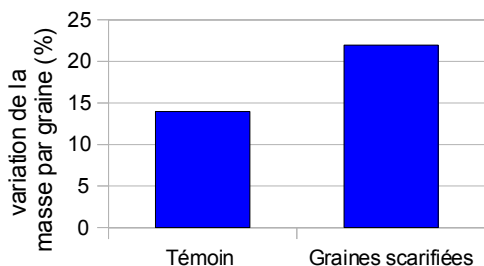


Figure 20: Variation de la masse d'une graine après imbibition.

A l'aide du même protocole que précédemment, nous avons obtenu les résultats de la Figure 20.

Le traitement au cutter permet une imbibition des graines similaire à celle obtenue pour 10 minutes de traitement à l'acide, mais les graines ne germent pas plus rapidement que le témoin. La meilleure imbibition permise par la création de fissures ne suffit donc pas à expliquer l'action de l'acide.

Les multiples fractures créées par l'acide sulfurique ont pu fragiliser le tégument et faciliter la sortie de la radicule, ce que n'aurait pas permis une seule entaille.

Pour tester cette hypothèse, deux expériences pourraient être envisagées :

- Faire sécher les graines dans une étuve, ce qui permettrait de tester si les fissures sont consécutives à une dessiccation. Cependant, le temps passé dans l'étuve serait bien supérieur à la durée du traitement par l'acide.
- Des fissures apparaissent souvent par la suite de chocs thermiques. Les graines pourraient être trempées successivement dans de l'azote liquide puis de l'eau bouillante.

Dans le cas de l'apparition de multiples fissures après ces traitements, semer les graines et observer la cinétique de germination. Il n'est cependant pas certain que les embryons survivent à ces traitements.

Conclusion

Le traitement à l'acide sulfurique et la comparaison avec les résultats de semis précédents nous a permis de montrer que la dormance des graines est levée avec le temps (ici quatre ans). Le temps optimal de traitement à l'acide est de dix minutes, car après surviennent des anomalies de croissance. Suite au traitement, des fissures apparaissent dans le tégument et elles sont sans doute reliées à l'augmentation de la capacité d'imbibition des graines.

Les graines traitées à la scie sauteuse ne germent pas, n'ont pas le tégument fissuré, mais ont une meilleure capacité d'imbibition. Le tégument ayant été poli, cela met en évidence une couche externe du tégument plus hydrophobe.

Enfin, le traitement au cutter entraîne une capacité d'imbibition similaire à des graines traitées dix minutes à l'acide, mais avec une cinétique de germination similaire à celle des graines témoins. On peut en conclure que l'imbibition seule ne permet pas une meilleure cinétique de germination, et que l'acide sulfurique doit donc avoir d'autres effets plus significatifs, comme la fragilisation supposée du tégument.

D'un point de vue cactophile, cette étude a le mérite de remettre en cause l'idée répandue mais sans doute erronée selon laquelle des graines fraîches sont toujours préférables, et que de mauvais résultats de semis sont toujours à mettre sur le compte de graines trop vieilles. Peut-être que l'ancienneté de certaines graines devrait devenir un argument de vente pour les producteurs ?

Enfin, je pense qu'il serait intéressant de tester la capacité germinative de vieilles graines pour des plantes telles que *Mammillaria theresae* ou *Mammillaria luethyi*, toutes deux de germination difficile, et toutes deux conservant les fruits plusieurs années dans leur tige en condition naturelles.

Bibliographie, webographie

- [1] Thèse présentée en 2003 par Magdalena Garcés Larrain pour obtenir le grade de « Magister en Ciencias Agropecuarias » à la « Pontificia Universidad Catolica de Chile ».
→ Introduction (pages 5 et 6), expérience 1 (pages 8 à 10 et pages 24 à 29) et conclusions (pages 49 à 51)
- [2] <http://www.cactuspro.com/> : présence d'un forum, d'une encyclopédie, d'articles de culture. Dernière consultation le 01/04/2010. Site collaboratif aux mises à jour très fréquentes.

Remerciements

- Alain Laroze, pour les graines et ses conseils.
- Michel Derouet, pour ses conseils, ses relectures particulièrement attentives, et pour avoir initié ce type d'étude.
- Christiane Perrier, pour son dévouement au service de ses élèves.
- Le personnel de la plateforme de microscopie électronique de l'Université Claude Bernard Lyon1, Béatrice Burdin qui en est responsable, et Béatrice Cavalié qui nous a mis en contact.